

(54) NOVEL LYSOZYME-SENSITIVE MICROORGANISM

(11) 58-56678 (A) (43) 4.4.1983 (19) JP

(21) Appl. No. 56-151464 (22) 25.9.1981

(71) KYOWA HAKKO KOGYO K.K. (72) RYOUICHI KATSUMATA(2)

(51) Int. Cl. C12N1/20,C12N15/00//C12P19/34(C12N1/20,C12R1/13)(C12N1/20, C12R1/15)(C12N15/00,C12R1/13)(C12N15/00,C12R1/15)

PURPOSE: To obtain protoplast of bacterium, without pretreatment with an agent such as antibiotic, etc. during culturing, only by treating lysozyme-sensitive bacteria belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus with lysozyme.

CONSTITUTION: A lysozyme-insensitive strain belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus is subjected to the mutagenic treatment, and a strain which cannot be grown in a medium containing lysozyme at an extremely low concentration (<about 25 μ g/ml) to allow the complete growth of the parent strain and nevertheless can be grown in a lysozyme-free medium. The objective lysozyme-sensitive bacteria belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus [e.g. *Corynebacterium glutamicum*, L-15 (FERM-P No.5946), *Corynebacterium herculis* L-103 (FERM-P No.5947), *brevibacterium devaricatum* L-204 (FERM-P No.5948), *Brevibacterium lactofermentum* L-312 (FERM-P No.5949), etc.] can be obtained by this process.

(54) METHOD FOR CULTURING ANAEROBIC BACTERIA AND AGENT FOR CONTROLLING CULTIVATION ATMOSPHERE

(11) 58-56679 (A) (43) 4.4.1983 (19) JP

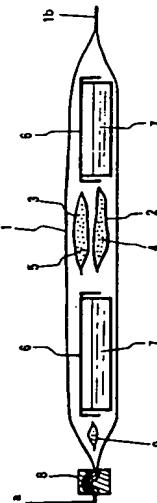
(21) Appl. No. 56-153830 (22) 30.9.1981

(71) MEITO K.K. (72) MAKOTO KASUGAI

(51) Int. Cl. C12N1/20,C12Q1/04//C01B31/20,C12R1/01,C12R1/145,C12R1/225

PURPOSE: To carry out the cultivation of anaerobic bacterial including *Fusobacterium nucleatum* in an atmosphere containing $\leq 0.1\text{vol\%}$ oxygen and $10\text{C}2\text{vol\% CO}_2$ gas.

CONSTITUTION: A laboratory dish 6 containing a cultivation medium 7 inoculated with a specimen is put into an outer packaging bag 1. Separately, permeable inner bags 2, 3 containing a disoxidation and CO_2 generating agent 4, 5 (a combination of ascorbic acid or its salt, an alkali carbonate and/or an alkali bicarbonate, and a reaction accelerator, etc.) are put into the outer bag 1. An indicator 9 for detecting the disoxidation state is also put into the outer bag 1, and the open end 1a of the bag is closed with a clip 8. The atmosphere in the bag can be maintained at an oxygen concentration of $\leq 0.1\text{vol\%}$ and a CO_2 concentration of $10\pm 2\text{vol\%}$ by this process.



(54) CULTIVATION OF PHOTOHYDROGEN-PRODUCING PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISM

(11) 58-56680 (A) (43) 4.4.1983 (19) JP

(21) Appl. No. 56-155737 (22) 30.9.1981

(71) KOGYO GIJUTSUIN (JAPAN) (72) ATSUSHI MIYAKE(2)

(51) Int. Cl. C12N1/20//C12P3/00(C12N1/20,C12R1/01)

PURPOSE: To carry out the photoproduction of hydrogen with hydrogen-producing photosynthetic microorganisms, for a long period, by adding a nitrogen source in the nighttime to the cultivation system of the microorganisms.

CONSTITUTION: In the photoproduction of hydrogen by the cultivation of photosynthetic bacteria having hydrogen-producing capability, e.g. *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170, etc., a nitrogen source such as ammonium sulfate, nitrogen gas, yeast extract, etc. is added to the cultivation system in the nighttime, especially at the beginning of the nighttime.

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭58-56678

⑫ Int. Cl.³
C 12 N 1/20
15/00
// C 12 P 19/34
(C 12 N 1/20
C 12 R 1/13)
(C 12 N 1/20
C 12 R 1/15)
(C 12 N 15/00
C 12 R 1/13)
(C 12 N 15/00
C 12 R 1/15)

識別記号

厅内整理番号
7235-4B
7235-4B
7258-4B

⑬ 公開 昭和58年(1983)4月4日
発明の数 3
審査請求 未請求

(全 12 頁)

⑭ 新規リゾチーム感受性微生物

⑮ 特 願 昭56-151464
⑯ 出 願 昭56(1981)9月25日
⑰ 発明者 勝亦暉
町田市成瀬2-12-3 ポプラケ

丘コープ6-401

⑱ 出願人 協和醸酵工業株式会社
東京都千代田区大手町1丁目6
番1号

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

新規リゾチーム感受性微生物

2. 特許請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、25μg/ml未満の濃度のリゾチームに感受性を示すリゾチーム感受性微生物。
- (2) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・ヘーセニリス、ブレビバクテリウム・デイバリカシムおよびブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムから過ばれる微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の微生物。
- (3) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミクムレーゼ、コリネバクテリウム・ヘーセニリスレーゼ、ブレビバクテリウム・デイバリカシムレーゼおよびブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムレーゼを有する。

ら過ばれる微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の微生物。

- (4) コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、25μg/ml未満の濃度のリゾチームに感受性を示すリゾチーム感受性微生物にリゾチームを作用させ、該微生物のプロトプラストを生成せしめることを特徴とするコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属微生物のプロトプラストの調製法。
- (5) コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、25μg/ml未満の濃度のリゾチームに感受性を示すリゾチーム感受性微生物にリゾチームを作用させ、得られるプロトプラストにデオキシリボ核酸を取り込ませ、ついで該プロトプラストを再生させることを特徴とするコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属微生物の形質転換法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新規リゾチーム感受性微生物ならびに該微生物を用いるプロトプラストの調製法か

および微生物の形質転換法に関する。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明は新規リゾーム感受性微生物ならびに該微生物を用いるプロトプラストの調製法および微生物の形質転換法を提供する。

本発明の新規リゾーム感受性微生物には、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\text{mM}/44\text{卒}$ の濃度のリゾームに感受性を示す微生物があげられる。本発明微生物は、培養中に抗生物質などの薬剤前処理を施すに、単にリゾーム処理でその細胞壁を溶解除去され、高張条件下でプロトプラスト化される。

試験管内でデオキシリボ核酸(DNA)をベクタープラスマドDNAに組込ませ、それを微生物細胞内に導入する遺伝子工学的技法は、最近非常に注目されている。

遺伝子工学的技法によつて得られる形質転換細胞は、ベクターの目的的複数に随伴して得られる異種マージの複数手段としても、他の異種

DNAの製造手段としても、また異種DNAを細胞内に存在させることによつて細胞に価値ある特性を付与する手段としても実現である。

この分野での研究の多くは大腸菌を宿主とする系で行われているが、大腸菌以外の工業的に有用な微生物、例えばアミラーゼなどの生産菌である枯草菌、抗生物質などの生産菌である放線菌および製造用アルコールの生産菌である酵母などでも「組換えDNA技法」を確立しようとの試みがなされている。

遺伝子工学技法では、ベクタープラスマドを導入したり、異種DNAを組込んだハイブリッドプラスマドを解析するのに、培養細胞からのプラスマドの分離操作が必接であるが、それには、まず細胞を破裂しなければならない。その破壊はDNAのせん断を防止するために緩和な条件で行う必要があるので、超音波やフレンチプレス等の機械的破壊法は適用できず、通常、細胞壁溶解酵素を用いる方法で行われている。前記の組換えDNA研究のなされている菌種に

はいずれも目的にかなり海綿酵素があり、それらが使用されている。

大腸菌や枯草菌など多くの細胞では、細胞壁溶解酵素リゾームにより容易に細胞壁を溶解除去できるが、リゾームで溶解され難い細菌もある。このような細胞壁溶解性の菌種では培養中に高濃度のグリシンなどのアミノ酸やペニシリンのような抗生物質に接触させて細胞をリゾーム感受性化させ、しかる後にリゾーム処理する方法がとられている。

グルタミン酸、リジン等多くのアミノ酸の工業生産に用いられるコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属に属する菌種は、通常、細胞壁がリゾームに溶解性であるので、従来、これらの菌種では培養中にペニシリンのような抗生物質を作用させた培養初期にリゾーム処理する前処理のことを細胞壁除去法が使われてきた。しかしながら、この方法は煩雑であるばかりでなく、高張条件下リゾーム処理することによつて生成する細胞壁除去細胞(プロト

プラスト)の正常細胞への復帰率(再生能)が低いなどの欠点がある。

本発明者らはコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種などの有用細菌において組換えDNA技法を確立せんがために、これら菌種の細胞壁の除去法について検索してきた。その一法として、本出願人が特開昭54-132796号公報に開示したコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種のリゾーム感受性菌株を用いてリゾームによる細胞壁の除去法を検討してきたが、これらの菌株はいずれもリゾーム非感受性株と同様にペニシリン等の前処理なしにはリゾームでその細胞壁が溶解除去されなかつた。そこでさらに検討した結果、該公報記載のリゾーム感受性菌株よりさらに高度のリゾーム感受性度を有するリゾーム感受性菌株はその細胞壁がペニシリン等で前処理するとともにリゾームで溶解されることを見出した。さらに本発明者らは、このような菌株を用いれば、細胞内からのプラスマド

の抽出が容易に行なえ、またリゾーム細胞で生成するプロトプラストの再生能が優れているためプロトプラストを用いるDMSによる性質転換を効率的に行わしめることができるとを見出し、本発明を完成するに至つた。

本発明のリゾーム感受性株はコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属のリゾーム非感受性株（例えば野生株）またはリゾーム低感受性株を親株とし、これを変異誘導処理して取得される。変異誘導の方法としては、紫外線照射、放射線照射、変異誘起剤処理等の通常の方法が用いられる。変異誘導された親株から本発明微生物のどときリゾームに耐感受性を有する菌株（以下本発明のリゾーム感受性株をリゾーム細胞感受性株ということとする）を選択するには、親株が、完全に生育する極めて低濃度のリゾーム（約15μg/ml未満）を含有する培地で生育できなくて、リゾーム無添加培地で生育できるものを選べばよい。

本発明の微生物の具体的例としては、コリネ

命名したユヌス-106株は土壤から分離した菌株で、その生物学的性状は次の通りである。生物学的性質の検討は“Manual of Microbiological Methods” by the Society of American Bacteriologist Committee on Bacteriological Technique (1957)に記載された方法で行つた。

I. 細胞形態

通常0.7~1.0×1.0~3.0ミクロンの球円あるいは短桿状であるが、培養条件により複数の細胞が直鎖状あるいはV字型に連鎖したような多形性を示す。グラム陽性、非運動性で胞子をつくらない。

II. 富栄養培地での生育特性

嫌天培地上での単集落は円状で、表面は丸穴を含び、色は淡黄色である。スラント上での生育は同じく淡黄色で不透明である。嫌天培地上の斜面培養では最も上でよく生育し、深部ではわずかに生育する。液体培養ではわずかに生育し若干絲状に沈降する。

バクテリウム・タルタミクムヨエスター-106株（微生物寄託登録番号ヨタタ）を親株として誘導されたユヌス-106株（微生物寄託登録番号ヨタタ）、コリネバクテリウム・ハーキュリスム△T0013868を親株として誘導されたユ-103株（微生物寄託登録番号ヨタタ）、プレビバクテリウム・デイバリカツム△T0014030を親株として誘導されたユ-304株（微生物寄託登録番号ヨタタ）およびプレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム△T0013659を親株として誘導されたユ-312株（微生物寄託登録番号ヨタタ）があげられる。これらのリゾーム感受性株は微生物工業技術研究所に登録され上記のような微生物登録番号がつけられている。さらに米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションにも△T00431833, 31834, 31866, 31867および31868としてそれぞれ登録されている。

なお、コリネバクテリウム・タルタミクムと

I. 生理的性質

- 1) 増殖：生適温度は25~37°Cだが、42°Cでかすかに生育する。
- 2) pH：生適pH 7~8だが、pH 6~9でも生育可能である。
- 3) 非耐熱性。
- 4) 好気性。
- 5) セラチンを液化しない。
- 6) カゼインを分解代謝しない。
- 7) インドール非産性。
- 8) カタラーゼ陰性。
- 9) 酵母非同化性。
- 10) グルコース、フラクトース、マンノース、マルトースから糖を生成するが、キシロース、ガラクトース、ラクトースおよびグリセロールからは糖を生成しない。
- 11) ピオテン要求性。
- 12) ピオテン量制限培地では多量のグルタミン酸を產生する。
- 13) 高濃度ピオテン含有培地では乳酸およ

びローケトタルタル酸を產生する。

以上の結果は、J. of Appl. Microbiol., 23, 379~381 (1967) に記載された細菌群と比較すると、コリネバクテリウム・グルタミクムに極めてよく一致している。それゆえ、ヨモギー-106株はコリネバクテリウム・グルタミクムと同定された菌株である。

リゾチーム非感受性のコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌株から本発明のリゾチーム超感受性変異株を取得する方法について具体的な例を以下に説明する。菌株を栄養培地に播種し20~30分で振盪培養する。対数増殖期半ばで培養を中止して無菌し、生理的食塩水で洗浄後、適当なヨリヨリ平衡液 (ヨモギー-8.0)、たとえばヨリヨリトリス-マレート緩衝液 (ヨモギー) に約 1×10^7 ~ 1×10^8 細胞/mlとなるように懸濁する。この懸濁液に最終濃度200~500 μg/mlになるようにニトロソグアニジンを加え、20~30分で30分~1時間放置する。

る。菌の生育が全く認められない最小のリゾチーム濃度を菌のリゾチーム感受性株 (最小生育阻止濃度) として各菌株と比較した結果を表1に示す。

本発明のリゾチーム超感受性変異株は前記の如くリゾチームヨモギー-235-106/μ含有するヨリヨリ天培地上で生育できない菌体として選択することによって得られるが、特開昭58-12274号公報に記載されたコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌株のリゾチーム感受性変異株はリゾチーム200~500 μg/ml含有するヨリヨリ天培地上で生育できない菌株を選択して得られたものであり、前者は本質的に掛つた性質を有する可能性がある。既に、これらの変異菌の細胞に用いたリゾチーム超感受性菌体は上記のリゾチーム感受性度測定法により最小生育阻止濃度200~500 μg/mlとは同一であるにもかかわらず、本発明の微生物のリゾチーム感受性 1.6~3.2 μg/mlは特開昭58-

過心分離により集めし、同一試験管で菌体を洗浄後、生垣的食塩水に懸濁し、生理的食塩水で過濾希釈して一定量を栄養酵天培地たとえばヨリヨリ天培地 (ヨリヨリムサモツ天培地) 上に盛りつける。ヨモギー-30で1~4日間培養し、生じたコロニーを栄養酵天培地と、ヨモギー-235-8/μのリゾチームを含有する栄養酵天培地とにレブリカ液を散布する。レブリカ平板をヨモギー-30で1~4日間培養後、栄養酵天培地で生育しリゾチーム含有

ヨモギー-235-8/μのリゾチームを含有するヨリヨリ天培地で生育しない菌をリゾチーム超感受性変異株として取得する。

上記の酵母株はいずれもこうして得られたリゾチーム超感受性変異株である。

リゾチーム超感受性変異株のリゾチーム感受性度は対数増殖期の約 10^8 細胞相当を倍々系列の濃度のリゾチームを含むヨリヨリ天培地上に播下培養し、30で4日間培養後、菌の生育状態を観察することによって測定でき

12274号公報記載のリゾチーム感受性菌株のリゾチーム感受性度ヨモギー-400 μg/mlとは明らかに掛つている。さらに前者ではベニシリンの前処理なくして容易に細胞壁が溶解除去されることに基づいて以下に説明する有用性を有するに対し、後者にはそれらの特性がないことから、リゾチーム超感受性菌株はリゾチーム感受性菌株とは異質の菌株であることが明らかである。

第 1 表

菌 株	微生物研究所登録番号	ATCC	リゾチーム感受性度 最小生育阻止濃度 (MIC, μg/ml)
コリネバクテリウム・グルタミクム 235-106	5945	31833	800
コリネバクテリウム・グルタミクム L-1/2	5946	31834	3.2
コリネバクテリウム・ヘモリス ATCC13868	-		800
コリネバクテリウム・ヘモリス L-103	5947	31866	3.2
プレビバクテリウム・デイリカルム ATCC46020	-		800
プレビバクテリウム・デイリカルム L-204	5948	31867	1.6
プレビバクテリウム・デイリカルム ATCC13863	-		800
プレビバクテリウム・ラクトブエノラム L-3/2	5949	31868	3.2

リゾチームで容易に細胞壁が溶解除去される本発明の微生物の有用性は、1) 細胞壁が除去されたプロトプラストの再生能が優れていることに基づき、そのプロトプラストを用いることによつてコロニーによる効率的な形質転換を可能ならしめ、2) 細胞中からのプラスミドのようなDNAsの抽出分離を容易にする、などの点にある。以下詳細に説明する。

1) 本発明微生物からのプロトプラストの調製および該プロトプラストを用いるDNAによる形質転換

プロトプラストの調製は単に地盤培地させた細胞を直接リゾチーム処理することによつて行われる。培地は菌が増殖できるものであればよく、例えば栄養培地Bを用いる。培地に菌を接種し、24~27℃で数日培養して対数期の中期あるいは後期まで培養し細胞を調整する。次いで適当な高強度培地に歯粉濃度0.5~1.0%/mlのリゾチームを含む液に懸滴する。高強度培地として

初発の正常細胞の10%以下にすることができる。

このようにして調製されるプロトプラストは適当な高強度天培地上でコロニー形成(再生能)を有する。高強度天培地としては、例えばROGP培地(グルコース1g、酵母エキス2.5g、KH₂PO₄ 1.5g、K₂HPO₄ 1.5g、MgCl₂·6H₂O 0.41g、FeSO₄·7H₂O 1.0g、MnSO₄·4H₂O 0.04g、ZnSO₄·7H₂O 0.9g、(NH₄)₂MoO₄·4H₂O 0.04g、ビオチン30μg、サイアミン塩酸塩2mg、コハク酸二ナトリウム1.5g、ポリビニルビロリドン(分子量1,000)3.0gを純水1lに含み、pH 7.2に調整した培地)を用いることができる。ROGP培地でのプロトプラストの再生は、自然、リゾチーム処理濃度および処理時間によつて若干異なるが、リゾチーム処理供試初発正常細胞あたり20~70%の効率である。また得

は、例えばRGM培地(グルコース2.0g、(NH₄)₂SO₄ 1.0g、酵母エキス1.5g、KH₂PO₄ 1.5g、MgCl₂·6H₂O 0.41g、FeSO₄·7H₂O 1.0g、MnSO₄·4H₂O 0.04g、ZnSO₄·7H₂O 0.9g、CuSO₄·5H₂O 0.4g、Na₂B₄O₇·10H₂O 0.04g、(NH₄)₂MoO₄·4H₂O 0.04g、ビオチン30μg、サイアミン塩酸塩2mgを純水1lに含み、pH 7.2に調整した培地)の2倍希釈液中に0.6Mシロ糖、0.01M MgCl₂·6H₂Oを含み、pH 7.0~7.2に調整した培地とRMを使用することができる。30~37℃で反応することによつて正常細胞は次第にプロトプラスト化され、その割合は光学顕微鏡で観察できる。ほとんどの細胞がプロトプラスト化されるに要する時間は菌株によつて異なるが、前記条件で2~3時間である。リゾチーム作用後、この菌懸液中の低強度条件で破裂死せずに生残する正常細胞はリゾチーム処理に供試した

生コロニーの出現が認められるに要する培養日数は菌株で違があるが、効率できるまでの大きさになるのは3~7日である。

以上のような特性をもつ微生物から得られるプロトプラストのDNAによる形質転換は、ポリエチレンクリコール(PEG)またはポリビニルアルコール(PVA)と二価金属陽イオンとを共存する高強度条件下で該プロトプラストとDNAとを混合処理することによつて行われる。形質転換株は、前記のプロトプラストの再生と同様にROGP培地のどとき高強度天培地上でプロトプラストを再生させ、正常細胞として取得される。形質転換株は供与DNAに由来する遺伝子が細胞に付与する特徴的な質に基いて選択することができる。この選択は高強度天培地上で再生と同時に行つてもよく、あるいは一旦非選択性に再生させてから再生細胞を用ひ普通の高強度天培地上で行つてもよい。

このような方法を適用してこのプラスミドDNAで形質転換した場合、形質転換株は再生菌あたり 10^6 ~ 10^7 の頻度で得られる。

形質転換については後記実施例に具体例を述べる。

3) 形質転換株からのプラスミドDNAの単離

菌が増殖できる培地、例えばLB培地で培養し、集菌後、リゾチームを作用させて細胞壁を溶解させる。細胞壁からは、例えば Biochim Biophys Acta, 162 #57-63 (1970) に記載されたような通常用いられる方法によりプラスミドを容易に単離分離できる。

使用するリゾチームの濃度は、対数の細胞により異なるが通常 $1\sim10\text{mg}/\text{ml}$ の濃度で行う。

グルタミン酸、リジンや多くのアミノ酸の工業的大量生産に用いられるコリオバク

テリウム菌およびプレビバクテリウム属菌への組換えDNA手法の適用は、それらの菌種あるいはその他の微生物からアミノ酸などの有用物質の生合成あるいはその細胞内に與する遺伝子をクローニングし、その遺伝情報の増幅に基づく生合成系の強化により有用物質の生産量を増大させたり、さらには動植物の遺伝子をクローニングし、その遺伝情報の発現により有用なペプチドをこれらの菌類を用いて生産させ得る可能性があり、実業上極めて有用である。本発明のリゾチーム感受性微生物は、組換えDNA挿入導入の前提条件となる細胞中からのプラスミド等のDNAの抽出分離、DNAによる細胞の形質転換などを効率的に行わしめることを可能にし、それゆえコリオバクテリウム菌およびプレビバクテリウム菌における組換えDNA挿入の適用を容あならしむるものである。

本発明者らは、本発明微生物がさらに組換えDNA手法における安全な宿主微生物として有用であることを見出した。

組み換えDNA手法において安全なホスト（宿主）ペクター系の確立がまず第一に要求される。安全なホストの条件としては病原性が含まれて無いこと、人体に寄生しないこと、自然環境に放出された場合速やかに死滅することなどが挙げられる。最初に組み換えDNA手法に用いられた大腸菌は本来人体寄生性であり、その安全性については懸念のあるところであつたが、少なくとも長年実験室で細胞培養されてきたE-E. coli株については、その寄生性、病原性は著しく低下していることが判りB.Iホストとして認定された。このE-E. coli株を人体に投与した場合数日にわたり菌の排出がみられ検査率は約1%前後と報告されている（サイエンス209巻 391~394頁 1980年）。

組み換えDNA手法をアミノ酸・核酸・抗生素などの生産菌に拡大していく場合、これら

微生物の多くは土壤より分離されたもので、人体への寄生性は低いと考えられるが、なかには消化管内の条件に耐え増殖しないまでも、そのまま生きて回収される場合も考えられる。こうした菌種の安全性をさらに増すためには、消化管内の条件で死滅するような性質を人为的に付与することが考えられる。B.Iホストでは自然環境下に放置しても死滅するような致死性質を付与することが行なわれている。

本発明のリゾチーム感受性微生物について動物の消化管内の生存テストを行なつたところ、動物の消化管内で著しく死滅しやすいことを見出した。すなわち、ラットの雄マウス（体重 198 ± 1 ）一群2匹に1匹当たり約 $8\sim 8\times 10^6$ の下記微生物を経口投与して、腸内に残存する菌数と糞便中に検出される菌数を、それぞれの10倍モセジエネートを過酸化水素 \pm 平板培地において測定した。第2表に示す如く、本発明のリゾチーム感受性菌株は、既株に比べ著しく死滅して検出され腸内での生存菌数も著しく減

少していることがわかる。

第 3 表

使用微生物	回収率(%)		
	糞便中	糞中	糞便
コリネバクテリウム・グルタミクム 225-106	82.8	0.05	8.7×10^{-4}
L-15	4.2	$<0.3 \times 10^{-4}$	$<1.8 \times 10^{-4}$
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868	4.6	0.05	4.6×10^{-4}
L-103	3.4	$<0.2 \times 10^{-4}$	$<1 \times 10^{-4}$
フレビバクテリウム・ディ・パリカツム ATCC1402	87.2	0.09	8.4×10^{-4}
L-204	7.4	$<0.5 \times 10^{-4}$	$<1.1 \times 10^{-4}$
フレビバクテリウム・ラクトブアーモンタム ATCC13655	6.8	0.1	4.8×10^{-4}
L-312	5.6	$<7.4 \times 10^{-5}$	$<0.6 \times 10^{-4}$

■時間は菌授与後の経過時間。

0~20.5は0時(投与時)より20.5時間の間の
合計の糞便中の菌数。

■■20.5時間は20.5時間後に放したラットの糞内の
菌数。

さらに本発明のリゾチーム感受性菌株の種々な
薬剤に対する性質を調べたところ、種々の抗生素質
に感受性になつていていることを見出しました。

実験例1 リゾチーム超感受性菌株の製造

コリネバクテリウム・グルタミクム 225-106、コリネバクテリウム・ハーキュリス
ATCC13868、フレビバクテリウム・ディ・パリカツム ATCC1402およびフレビ
バクテリウム・ラクトブアーモンタム ATCC13655をLB培地(粉末ブイヨン20g、
酵母エキス5gを純水1lに含み、pH7.2に
調整した培地)に植菌し、30℃で振盪培養す
る。対数増殖期半ばで培養を中止して無菌し、
生理的食塩水で洗浄後、M/20トリス・マレ
ート緩衝液(pH6.0)に約 5×10^6 細胞/ml
となるように懸滴する。

この懸滴液に最終濃度 $0.0048\text{mg}/\text{ml}$ になるよう
にニトロソグアニジンを加え、23℃で30分
間放置する。遠心分離により懸滴し、同一緩衝
液で菌体を洗浄後、生理的食塩水に懸滴し、生
理的食塩水で適宜希釈して一定量をLB培地と
し、LB培地と $0.25\text{mg}/\text{ml}$ のリゾチーム含有LB培地と
に塗りつける。

すなわち、対数増殖期の約 10^4 細胞相当を含む
系列の濃度の薬剤を含むLB培地に接种し、30℃で2日間培養後、菌の生育状態
を観察することにより本発明微生物の感受性を
調べた結果、図3表に示すとく、ペニシリン
G、リファンビシンなどに極めて感受性であ
ることがわかつた。このことは、種々の薬剤で
菌株より殺菌、静菌しやすいことを示唆してお
り、組換えDNAのベクターとして薬剤耐性ブ
ラスミドを用いる場合の薬剤抵抗性の増大を緩
和する効用もあることを示している。

第 3 表

菌種	薬剤感受性(MIC, mg/ml)		
	リゾチーム	ペニシリンG	リファンビシン
コリネバクテリウム・グルタミクム 225-106	800	0.18	0.016
L-15	2.2	0.015	0.004

■ MIC: 最低生育阻止濃度

以上のごとく、本発明のリゾチーム感受性微
生物が、動物の消化管内で著しく死滅しやすく、
さらに種々の薬剤に対して感受性になつている
ことは、該微生物が組換えDNA用宿主微生物
として好ましい性質を有することを示している。

30℃で2日間培養し、生じたコロニーを栄養
寒天培地と $0.25\text{mg}/\text{ml}$ のリゾチームを含有す
るLB寒天培地にレブリカ血布する。レブリカ
平板を30℃で2日間培養後、LB寒天培地で
生育させ、リゾチーム含有寒天培地で生育しな
い菌をリゾチーム超感受性変異株として取得す
る。

第 3 表

菌種	リゾチーム感受性変異株
コリネバクテリウム・グルタミクム 225-106	コリネバクテリウム・グルタミクム L-15
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868	コリネバクテリウム・ハーキュリス L-103
フレビバクテリウム・ディ・パリカツム ATCC1402	フレビバクテリウム・ディ・パリカツム L-204
フレビバクテリウム・ラクトブアーモンタム ATCC13655	フレビバクテリウム・ラクトブアーモンタム L-312

実験例2

本発明微生物のリゾチームによる細胞壁溶解
除去と吉田プロトプラストの再生

コリオバクテリウム・グルタミクムヨヨタ-106、コリオバクテリウム・ハイキユリス ATCC13868、ブレビバクテリウム・デイバリカシム ATCC14020、ブレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム ATCC13635 および、それらから誘導され実験例1で得られたリゾーム超感受性変異株の細胞壁を、LB 培地に懸滴し、30℃で振盪培養する。東京光電比色計で 660 nm における吸光度 (OD) を測定し、OD 0.6 になつた時点で、生理的食塩水で適当に希釈して一定量を LB 培地に塗布し、初発の正常細胞数を測定すると同時に、培養液から細胞を無菌し、調製母を R 0.0 と培地化 1 回/回のリゾームを含む (DB7.6) に約 10 加倍/回となる様に懸滴し、1 回試験管に移して 30℃でゆるやかに加温反応する。

3 時間後細胞を 2500 × g で 10 分間心分離して回収し、前記 ATCC 培地に懸滴して、回速心洗浄後、等容量の ATCC 培地に再懸滴してプロトプラスト形成を調査した。この一部を

いずれの菌株も、リゾームを作用させても感覚的で粗棒状の正常細胞しかみられず、本状のプロトプラストの生成は観察されない。また供試条件でのコロニー形成数もリゾーム処理前とはほとんど変わらなかつた。一方、リゾーム超感受性菌株は、リゾームの細胞壁溶解作用によりプロトプラスト化され、プロトプラストの破壊死する供試条件で生育可能な既存菌株（後述圧シロップ抵抗性の非プロトプラスト細胞と考えられる）は、リゾーム処理供試菌数あたり $10^5 \sim 10^6$ であつた。これらのプロトプラストは、高強条件ではコロニー形成能を有し、その再生効率はリゾーム処理供試菌数に対して 20 ~ 70 % であつた。一旦再生したコロニーは LB 培地で生育できる正常細胞であつた。

実験例 1

本発明微生物から得られるソロトプラストのプロスマドローネリバクによる形質転換 /) プラスマドローネリバクの分離

とり、一つは X-GOP 培地で適当に 希釈して一定量を LB 培地へ塗布無菌し、もう一つは生理的食塩水で適当に希釈して LB 培地へ塗布無菌し 30℃で培養して、各々高強条件、供試条件でのコロニー形成可認菌数 (cfu/m) を求めた。供試条件での生成コロニー数は、培養 2 日目に測定した（さらに培養しても数は増加しない）。高強条件での生成コロニー数は、それ以上培養しても再生コロニーが増加しない 7 日目に測定した。これらの結果を第 3 表に示す。

第 3 表

菌 体	リゾーム処理供試菌数 (cfu/m)	リゾーム処理後形成可認菌数 (cfu/m)	高強条件	供試条件
コリオバクテリウム・グルタミクム L15	1.8×10^5	2.8×10^5	6.7×10^5	
コリオバクテリウム・グルタミクム ATCC-106	2.8×10^5	2.1×10^5	2.9×10^5	
コリオバクテリウム・ハイキユリス L103	1.2×10^5	6.5×10^5	2.6×10^5	
コリオバクテリウム・ハイキユリス ATCC13868	1.8×10^5	1.8×10^5	1.4×10^5	
ブレビバクテリウム・デイ・リカルム L204	9.6×10^5	1.1×10^5	6.4×10^5	
ブレビバクテリウム・デイ・リカルム ATCC14020	1.2×10^5	1.3×10^5	1.4×10^5	
ブレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム L312	1.0×10^5	1.4×10^5	2.3×10^5	
ブレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム ATCC13635	1.1×10^5	2.9×10^5	1.0×10^5	

本実施例において形質転換に使用するプラスマドローネリバクは、D 0.0 % の保有菌であるコリオバクテリウム・グルタミクムヨヨタ-230 (株工研新規受贈番号第 599 号) の培養液から次のように抽出分離した。コリオバクテリウム・グルタミクムヨヨタ-230 を LB 培地で培養した粗培養液を、400 ml 半分培地 8.8 M に接種して 30℃で振盪培養する。東京光電比色計で 660 nm における吸光度 (OD) を測定し、OD が 0.6 になつた時点で、培養液中の単位/回の濃度になるようペニシリントリスを添加する。さらに 30℃で培養を継続し、OD 約 0.6 になるまで生育させる。

培養液から菌体を採取し、23 日後街吸 (0.03 M リトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、0.005 M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) 0.05 M HAc : pH 8.0) で洗浄後、リゾーム液 (ヨウ素カリウム、0.1 M NaOEt、0.05 M

トリス、0.8M/メリゾーム、- pH 8.0)で1.0Mに稀釈し、37°Cで4時間反応させる。反応液は、2M NaCl 2.4M、0.3M EDTA (pH 8.0) 0.6M、4M ラウリル硫酸ナトリウムと2M NaClからなる緩衝液を順次滴加し、緩やかに搅拌してから氷水中に1.5時間置く。核酸物全量を遠心管に移し、4°Cで60分間、6%×8の遠心分離にかけて上澄液をとる。これに重量百分率1.0%相当のPEG 4000を加え、静かに混和して懸濁液氷水中に置く。1.5時間後、1.800×8で10分間遠心分離してペレットを回収する。T2E8緩衝液を加えて、ペレットを静かに再溶解してから1.5Mエチジウムプロマイドを滴加し、これに塩化セシウムを加えて静かに搅拌し、密度を1.820に合わせる。この溶液を1.0M×8、1.800×8で1.5時間遠心分離する。この密度勾配遠心により、共有結合で閉じられた環状DNAは、紫外線ランプを照射すること

によつて遠心ナープ中下方の密度の高いバンドとして見出される。このバンドを注射器で遠心ナープの側面から抜きとることによつて、プラスミドRNAが分離される。次いで分離液を等容量のイソプロピルアルコール液〔容量百分率1.0%イソプロピルアルコール、1.0%T2E8緩衝液(この溶液中に塩化セシウムを含む)〕で1回処理してエチジウムプロマイドを抽出除去し、しかる後に、T2E8緩衝液に対して透析する。このようにして1.5gのプラスミドRNAが得られる。

プラスミドRNAは約ノタメガダルトンの分子量を有し、ストレプトマイシンおよびまたはスペクチノマイシン耐性を示す遺伝子を有し、かつ分子中にBamHI, ^{BamHI}, EcoRIおよびHindIIIによる切断部位をそれぞれ、6, 7, 6および6個有している新規プラスミドである。

2) プラスミドRNAの形質転換

形質転換性、実施例2と同様に細胞を用いて行つた。プロトプラスト菌液0.5mlを小試験管にとり、2.500×8で5分間遠心分離し、T8.4M緩衝液(1.0M塩化マグネシウム、2.0M塩化カルシウム、5.0Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(トリス)、4.00LMシロ糖、1.0M)0.5mlに再懸濁して遠心沈降する。沈降したプロトプラストに0.1MのT8.4M緩衝液を加え、ゆるやかに撹つて再懸濁する。これに上記の3倍高濃度のT8.4M緩衝液と1対1に混合した2.00%DNA液0.1ml(0.2μg DNA含有)を加えて撹拌し、次いでT8.4M緩衝液中に2.0%と2.0Mを含む液0.5mlを添加してゆるやかに混合する。3分後、BOGP培地2mlを添加し、1.800×8で5分間遠心分離にかけて上虹吸液を除去し、沈降したプロトプラストを0.1MのDNAと培地に懸濁してからBOGP培地で数試験管に分

取し、一定量をスペクチノマイシン800ug/mlを含むBOGP液体培地に植株する。同時にコロニー形成可能菌数を知るために、BOGP液体培地にも高希釈度の液を一定量植株する。30°Cで6日間培養して出現したコロニー数を測定する。

スペクチノマイシン含有BOGP培地で生じたコロニーをとり、1.25mg/mlのストレプトマイシンを含むTB液体培地に植りつけ、30°Cで2日培養してストレプトマイシン耐性形質の有無を調べた。交差耐性を示した株を無作為に選び、実施例4に示す方法でプラスミドを単離した。

これらの結果を表4表にまとめて示した。

受 て 口	菌 の 様		
	スペクタノマイシン耐性菌出現率 耐性菌出現率	リゾバクテリウム耐性菌の性質 耐性菌性	DCU%の値
コリネバクテリウム・グルタミル L/S-106	1.7×10 ⁻⁷	-(3/3)	-(3/3)
コリネバクテリウム・グルタミル L/S	2.6×10 ⁻⁷	+(30/30)	+(3/3)
コリネバクテリウム・ハイキュリス ATCC/3688	<1.8×10 ⁻⁷		
コリネバクテリウム・ハイキュリス L/S	2.9×10 ⁻⁷	+(30/30)	+(3/3)
フレビバクテリウム・ハイカリカム ATCC/6020	2.8×10 ⁻⁷	-(3/3)	-(3/3)
フレビバクテリウム・ハイカリカム L/S	1.0×10 ⁻⁶	+(30/30)	+(3/3)
フレビバクテリウム・ラクトファンダム ATCC/3688	2.1×10 ⁻⁷	-(3/3)	-(3/3)
フレビバクテリウム・ラクトファンダム L/S	2.6×10 ⁻⁷	+(30/30)	+(3/3)

■ 高強度条件でのコロニー形成可能菌(再生菌)あたりの概要。

■ 菌株内は試験体数。

■ この菌株ではスペクタノマイシン耐性菌は得られなかつた。

リゾバクテリウム非感受性の菌株をリゾバクテリウム処理した細胞で出現したスペクタノマイシン耐性株は、ストレプトマイシン感受性を示さず、さらに前記のヨコターヨタの株と同様にプラスミドを増殖したが、200%の存在は認められなかつた。一方、リゾバクテリウム感受性菌株をリゾバクテリウム処理した細胞で出現したスペクタノマイシン耐性株はストレプトマイシン感受性を有し、それらの株から分離されるプラスミドは、制限酵素B16aⅢで消化後アガロース電気泳動にかけてわかる生成DNA断片が200%と同一であつた。

上記のようにして得られた200%の形質転換株の竣工研究会登録番号を第5表に示す。

第 5 表

受 て 口	200%形質転換株	竣工研究会登録番号
コリネバクテリウム・グルタミル L/S	L/S/D004	3946
コリネバクテリウム・ハイキュリス L/S	L/S/D004	3947
フレビバクテリウム・ハイカリカム L/S	L/S/D004	3948
フレビバクテリウム・ラクトファンダム L/S	L/S/D004	3949

実施例6

プラスミドを保有する微生物からのプラスミドの単離

実施例3で取得した200%の形質転換株であるコリネバクテリウム・グルタミルL/S/200%、コリネバクテリウム・ハイキュリスL/S/200%、フレビバクテリウム・ハイカリカムL/S/200%およびフレビバクテリウム・ラクトファンダムL/S/200%をLB培地で培養した後培養液を400mLB培地に種菌し、30℃で12時間振盪培養する。

培養液から菌体を採取し、T6日酸鈉液で洗浄後、リゾバクテリウム(2.5gシロ糖、0.1M NaCl、0.02Mトリス、0.8M/モリソーム：PH8.0)1.0mlに懸滴し、37℃で1時間反応させる。以降液に2M NaOAc 2ml、0.5M EDTA(2HES)0.6ml、メチラウリル硫酸ナトリウムとの2M NaOAcからなる浴液を順次滴加し、緩やかに温めてから水水中に12時間

置く。細胞物質量を遠心管に移し、4℃で60分間、48000×gの遠心分離にかけ上清液をとる。これに重量百分率10%の硫酸200mlを加え、静かに攪拌して溶解後水水中に置く。16時間後、12000×gで10分間遠心してペレットを回収する。T6日酸鈉液2mlを加えてペレットを再溶解してから1.5ml/mlエチジウムプロマイド2mlを添加する。これに塩化セシウムを加えて溶解し、密度を1.820に合わせる。この溶液を実施例3に記載したのと同一条件で密度勾配遠心にかけ、プラスミドを分離採取する。分離液を実施例3と同様にイソプロピルアルコール液処理によりエチジウムプロマイドを抽出除去した後、T6日酸鈉液に對して透析する。

このようにして200%を保有するいずれのリゾバクテリウム感受性菌からも15~30mgのDODG%DNAが得られた。

特許出願人(102)協和醸酵工業株式会社

代表者 木下根治



手続補正（自発）

昭和 57年 6月 16日

第1頁の続き

②発明者 岡徹夫

横浜市緑区奈良町2360-17

②発明者 古屋晃

川崎市多摩区多摩美1-10-5

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和 56年特許願第 15146号

2. 発明の名称

新規リゾチーム感受性微生物

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名称 (102) 高和研磨工業株式会社
(TEL: 03-201-7211 内線 2751)

代表者 木下祝郎

4. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄および発明の詳細な説明の欄

5. 補正の内容

(1) 特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。

- (2) 明細書第12頁3行～5行目の「栄養寒天培地----含む培地」を「完全培地たとえば富栄養培地(NB)に寒天1.8%を加えた培地」に訂正する。
- (3) 明細書第12頁7行目および同第13頁6行目の「25～25μg/ml」を「25～25μg/ml」に訂正する。
- (4) 明細書第23頁下から6行目の「菌数」を「菌の回収率」に訂正する。
- (5) 明細書第23頁下から8～4行目の「放したラットの腸内の菌数」を「切歎したマウスの腸内の菌の回収率」に訂正する。
- (6) 明細書第25頁10行目の「と125μg/mlのリゾチーム含有寒天培地と」を削除する。
- (7) 明細書第26頁2行目の「リゾチーム」を「卵白リゾチーム(生化学工業社製、6回再結晶)」に訂正する。
- (8) 明細書第26頁5行目の「生育させ、」を「生育し、」に訂正する。
- (9) 明細書第26頁8行日の「第2表」を「第

4表」に訂正する。

- 00 明細書第27頁16行目の「約10細胞」を「約10³細胞」に訂正する。
- 01 明細書第28頁10行目および11行目の「第3表」を「第5表」に訂正する。
- 02 明細書第31頁3行目の「反応液は、」を「反応液に、」に訂正する。
- 03 明細書第32頁下から2行目の「4、6、8、8」を「4、7、9、6」に訂正する。
- 04 明細書第34頁14行目および同第35頁1行目の「第4表」を「第6表」に訂正する。
- 05 明細書第36頁14行目および15行目の「第5表」を「第7表」に訂正する。
- 06 明細書第36頁の14行目および表中の「教工研寄託受理番号」を「教工研譲付」に、同表中「5946、5947、5948および5949」をそれぞれ「5950、5951、5952および5953」に訂正する。
- 07 明細書第36頁2,3,4,9,12および14～15行目、第14頁の第1表中、および第20頁

「行目の「微工研寄託受理番号」を「微工研
寄」に訂正する。

6.添付書類の目録

微生物受託番号通知書 写 1通

- 許請求の範囲第1項記載の微生物。
- (4) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\mu g/ml$ 未満の濃度のリゾチームに感受性を示すリゾチーム感受性微生物にリゾチームを作用させ、該微生物のプロトプラストを生成せしめることを特徴とするコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属微生物のプロトプラストの調製法。
- (5) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\mu g/ml$ 未満の濃度のリゾチームに感受性を示すリゾチーム感受性微生物にリゾチームを作用させ、得られるプロトプラストにデオキシリボ核酸を取り込ませ、ついで該プロトプラストを再生させることを特徴とするコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属微生物の形質転換法。
- (6) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\mu g/ml$ 未満の濃度のリゾチームに感受性を示す微生物を組換えDNA技術の宿主微生物として用いる方法。

特許請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\mu g/ml$ 未満の濃度のリゾチームに感受性を示す新規リゾチーム感受性微生物。
- (2) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・ハーキュリス、プレビバクテリウム・ディバリカツムおよびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムから選ばれる微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の微生物。
- (3) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミクム L-15 (微工研寄 5946, ATCC 31884), コリネバクテリウム・ハーキュリス L-108 (微工研寄 5947, ATCC 31886)、プレビバクテリウム・ディバリカツム L-204 (微工研寄 5948, ATCC 31887) およびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム L-312 (微工研寄 5949, ATCC 31888) から選ばれる微生物であることを特徴とする特

- (7) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\mu g/ml$ 未満の濃度のリゾチームに感受性を示し、プラスミド pCG4を担う新規リゾチーム感受性微生物。
- (8) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・ハーキュリス、プレビバクテリウム・ディバリカツムおよびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムから選ばれる特許請求の範囲第7項記載の微生物。
- (9) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミクム L15/pCG4 (微工研寄 5950)、コリネバクテリウム・ハーキュリス L108/pCG4 (微工研寄 5951)、プレビバクテリウム・ディバリカツム L204/pCG4 (微工研寄 5952) およびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム L312/pCG4 (微工研寄 5953) から選ばれる特許請求の範囲第8項記載の微生物。